

db  
Bibliotheek  
Proefstation  
Naaldwijk

A

1

V

78

PROEFSTATION VOOR DE GROENTEN- EN FRUITTEELT ONDER GLAS,  
TE NAALDWIJK.

Bacteriologisch onderzoek in verband met Mn-reductie in grond na stomen.

door:

P.Koornneef,

S.J.Voogt.

Naaldwijk, 1969.

2232086

PROEFSTATION VOOR DE GROENTEN- EN FRUITTEELT ONDER GLAS TE NAALDWIJK

Bacteriologisch onderzoek in verband met Mn-reductie in grond na het stomen.

I. Probleemstelling

Mangaanvergiftiging bij sla, uitgeplant op gestoomde grond, wordt veroorzaakt door te veel beschikbaar mangaan, dat door reductie en dehydratatie tijdens het stomen is vrijgekomen. De oxidatie van mangaan vindt daarna langzaam plaats, waarbij mangaan-oxiderende bacteriën mogelijk een belangrijke rol spelen.

In dit verslag wordt een onderzoek beschreven waarbij nagegaan is of in ongestoomde en gestoomde gronden bacteriën voorkomen, welke mangaan neerslaan in diverse voedingsbodems.

II. Ophoping van Mn-oxiderende bacteriën

Bij de ophoping is gebruik gemaakt van twee verschillende media :

- a) 30 gr grond werd gemengd met 25 ml gedemineraliseerd water. Dit mengsel werd toegevoegd aan 100 ml gedemineraliseerd water, dat 2% agar bevatte en een temperatuur had van 40°C.

Het uitgangsmateriaal bestond uit zavel en klei, beide gestoomd en ongestoomd. De klei was afkomstig van „Proefbedrijf Delft” en de zavel van „Proeftuin Naaldwijk”.

Er werden zes platen gegoten van zowel zavel ongestoomd en gestoomd als van klei ongestoomd en gestoomd. Nadat de massa in deze schalen afgekoeld was, werd in het centrum een gat van 3 cm geponst, dat opgevuld werd met een mengsel van 1%  $\text{MnSO}_4$  en 2% agar in gedemineraliseerd water.

Daarna werden de schalen weggezet in een stoof bij een temperatuur van  $25^\circ\text{C}$ .

b) 1%  $\text{MnCO}_3$  en 2% agar in gedemineraliseerd water.

Van dit mengsel werden eveneens platen gegoten; na afkoeling werd een suspensie van 30 gr grond met 25 ml gedemineraliseerd water, van zowel gestoomde en ongestoomde klei als van gestoomde en ongestoomde zavel, hierop uitgestreken. Daarna zijn deze platen bebroed bij een temperatuur van  $22^\circ\text{C}$ .

Na één week werden de platen ad a) beoordeeld. De platen met gestoomde gronden vertoonden geen groei; de platen met ongestoomde gronden vertoonden duidelijk bruinzwarte vlekken aan de rand van de  $\text{MnSO}_4$  schijf.

Op de platen, ingezet volgens b) was na vijf dagen geen groei waar te nemen, uitgezonderd de platen waarop ongestoomde klei was uitgestreken, deze vertoonden aan de rand bruinzwarte kolonies. Drie dagen later bevonden zich enkele bruine kolonies op de platen met ongestoomde zavel. De platen met de gestoomde gronden vertoonden na acht dagen nog steeds geen bacteriegroei.

De platen met ongestoomde klei en zavel vertoonden een duidelijke positieve reactie met Benzidine-HCl : er verscheen een blauwe kleur vooral rond de kolonies. Deze blauwe kleur wijst op aanwezigheid van geoxideerd mangaan.

De platen waarop gestoomde klei en zavel was uitgestreken vertoonden een zwakke positieve reactie : er verscheen een zeer lichte blauwe kleur; dit was waarschijnlijk te wijten aan chemische-oxidatie van mangaan.

### III. Isolatie van Mn-oxiderende bacteriën

Voor de isolatie van de bacteriën, die op de ophopingsplaten waren gekweekt, werden vier verschillende media gebruikt.

- 1) volgens Gerretsen : 2 % Ca-ditraat  
0,5 %  $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{ aq.}$   
0,2 %  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$   
0,001%  $\text{NH}_4 \text{ Mg PO}_4$   
2 % agar  
leidingwater  
pH 6,0

(gesteriliseerd gedurende 20 minuten bij 1 atmosfeer overdruk).

- 2) volgens Beyerinck : 1 %  $\text{MnCO}_3$   
0,05 %  $\text{K}_2\text{H PO}_4$   
0,05 %  $\text{NH}_4 \text{Cl}$   
2 % agar  
leidingwater  
pH 7,9

(gesteriliseerd gedurende 20 minuten bij 1 atmosfeer overdruk).

- 3) Grond- Mn- agar : 100 gr steriele zavelige grond  
400 ml leidingwater  
8 gr agar  
0,025 gr  $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{ aq.}$   
pH 6,8

(gesteriliseerd gedurende 20 minuten bij 1 atmosfeer overdruk).

De gebruikte steriele zavel is gedurende zeven dagen elke dag gesteriliseerd gedurende 20 minuten bij 1 atmosfeer overdruk.

- 4) Grondextract - agar : 25 gr grond (steriele zavel)  
in 500 ml leidingwater laten  
bezinken en daarna afgeschonken:

10 gr agar aan grondextract toe-  
gevoegd.

pH 6,8.

(gesteriliseerd gedurende 20 min. bij 1 atm.  
overdruk).

Van ieder medium werd een aantal platen gegoten, van het medium „Grondextract-agar“, werd een dubbel aantal platen gegoten, in de helft van dit aantal platen werd een gat van 3 cm geponst, wat werd opgevuld met een mengsel van 1%  $MnSO_4$  en 2% agar in gedemineraliseerd water.

Van de bruin-zwarte vlekken van de ophopingsplaten werden suspensies gemaakt in steriel water. Vervolgens werd één druppel van deze suspensie uitgestreken op de zo juist beschreven platen. Daar de ophopingsplaten met ongestoomde klei waren verongelukt kon er alleen, van de bacteriën, die zich op de ophopingsplaten van ongestoomde zavel bevonden, een suspensie worden gemaakt.

De platen werden daarna weggezet bij een temperatuur van 22°C. Na één week bebroeden, was de beste en tevens snelste bacteriegroei op het medium van „Gerretsen“, te constateren, ook was er een behoorlijke bruinkleuring rond de bacteriekolonies.

De groei op het medium volgens „Beyerinck“, was minder en langzamer en de bruinkleuring was eveneens minder intensief. Bij de andere media was na één week bijna nog geen groei te zien; na veertien dagen was er enige groei te bespeuren, bij enige schalen was een lichte bruinkleuring te zien. Alle schalen reageerden positief met Benzidine-HCl, behalve de schalen met het medium „Grondextract - agar“ zonder Mn-agar schijf, deze reageerden negatief.

Er is tevens gereageerd met Benzidine-HCl op een voedingsbodem die niet bebroed is geweest, hierbij was de reactie negatief.

#### IV. Experimenten met verschillende concentraties $\text{MnSO}_4$

Er is 20 gr steriele grond met 400 ml leidingwater gemengd. Na enige tijd is de bovenstaande vloeistof afgeschonken.

Vervolgens is dit grondextract gedeeld in vier porties van 100 ml en aan iedere 100 ml respectievelijk 0,5 0,25 0,01 en 0,005%  $\text{MnSO}_4$  toegevoegd.

Van deze aldus verkregen media zijn platen gegoten. Van de bruinzwarte vlekken van de ophopingsplaten werden weer suspensies gemaakt in steriel leidingwater. Vervolgens werd één druppel van deze suspensie op de zo juist beschreven platen uitgestreken. De platen zijn daarna bebroed bij een temperatuur van  $22^\circ\text{C}$ .

Na vier weken vertoonden de platen met de laagste concentraties  $\text{MnSO}_4$  de snelste en tevens beste bacteriegroei. Hoe hoger de concentratie  $\text{MnSO}_4$  werd, des te minder groei er op de platen te zien was.

Bij de platen met 0,25%  $\text{MnSO}_4$  zagen we echter een heel ander beeld van bacteriegroei, we zagen bacteriewolken en bij de lagere concentraties  $\text{MnSO}_4$  zagen we meer bacteriënkolonies, die uit stippen bestonden.

De platen met de laagste concentraties  $\text{MnSO}_4$  reageerden positief op Benzidine-HCl. De platen met de hoogste concentratie, gaven geen blauwe, maar een paarsige groene kleur als reactie op Benzidine-HCl.

#### V. Reingekweekte Mn-oxiderende bacteriën, geïsoleerd op het medium volgens Gerretsen en bebroed bij verschillende temperaturen.

Op platen, gegoten met medium volgens Gerretsen, werden reingekweekte Mn-oxiderende bacteriën uitgestreken.

Daar de isolatie op het medium volgens Gerretsen het beste resultaat opleverde, zijn enkele kolonies van dit medium gesuspenderd in steriel leidingwater en opnieuw uitgestreken op medium volgens Gerretsen. De zo juist beschreven handelswijze is nog twee maal herhaald. Daarna kan er verondersteld worden dat Mn-oxiderende bacteriën volkomen reingekweekt waren.

Met deze bacteriën kan men dus verder gaan experimenteren.

Daarna zijn de platen bebroed bij 27°C, 22°C en 16°C. Na vier dagen werd de eerste bruinkleuring waargenomen bij de schalen, weggezet bij 27°C. Twee dagen later begonnen de schalen weggezet bij 22°C ook bruin te kleuren. De schalen weggezet bij 16°C vertoonden na negen dagen na inzetten, de eerste bruinkleuring.

De temperatuurschommelingen bij bovengenoemde temperatuurproef waren :

Bij de behandeling van 27°C	:	25° - 27°C
bij de behandeling van 22°C	:	21,5° - 23,5°C
bij de behandeling van 16°C	:	15,2° - 16,8°C

Tenslotte werd nog een medium : Grondextract-agar, waaraan Ca-citraat was toegevoegd, vergeleken met grond-extract-agar waaraan  $\text{MnSO}_4$  was toegevoegd.

Er werd als volgt te werk gegaan : 10 gr steriele zavel werd gemengd met 200 ml leidingwater : nadat het bezonken was, werd dit grondextract afgeschonken en is aan 100 ml van dit extract 2 gr agar + 1 mg Ca-citraat toegevoegd. Aan de andere 100 ml van dit grondextract is 2 gr agar + 5 mg  $\text{MnSO}_4$  toegevoegd. Het mengsel met Ca-citraat had een pH 6,5 en het mengsel  $\text{MnSO}_4$  een pH 5.

Van deze twee mengsels werden platen gegoten, waarop een suspensie van reingekweekte, Mn-oxiderende bacteriën werd uitgestreken. Daarna bebroed bij 22°C.

Na  $\pm$  drie weken vertoonde de voedingsbodem met Ca-citraat de beste en snelste bacteriegroei. Op beide media werd op dat moment geen bruinkleuring waargenomen. De schalen werden daarna weggedaan omdat de voedingsbodems begonnen te scheuren. Alhoewel niet verwacht, reageerden beide media negatief op Benzidine-HCl.

#### Samenvatting en conclusies

Ophoping van mangaanoxiderende bacteriën vond plaats door aan een grond-water-mengsel 1%  $\text{MnSO}_4$  en 2% agar toe te voegen. De indruk is dat  $\text{MnCO}_3$  minder geschikt was dan  $\text{MnSO}_4$ .

Isolatie ging het snelst op medium volgens Gerretsen (pH 6,0).

Een temperatuurproefje gaf de indruk dat bij 27°C de groei sneller verliep dan bij 22°C.

Naaldwijk, december 1968

De proefnemers :

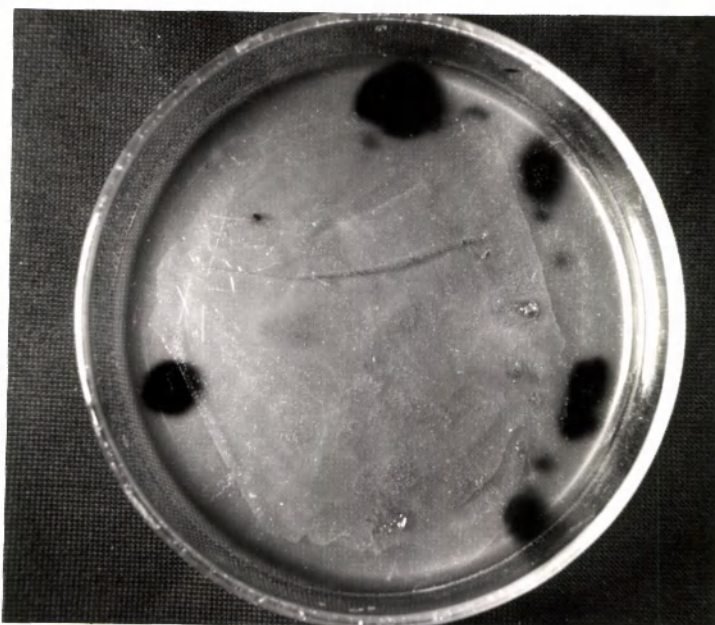
S. Voogt en  
P. Koornneef.





*Fig. 1*

Een voedingsbodem, bevattende 1%  $\text{MnCO}_3$  en 2% agar in gedemineraliseerd water. Hierop een suspensie uitgestreken van gestoomde klei. Na 8 dagen bebroeden geen groei.



Een voedingsbodem als figuur 1.  
Hier echter een suspensie aangebracht van ongestoomde klei.  
Na 5 dagen bebroeden bruin-zwarte kolonies aan de rand van de plaat.